



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **10218768 A**(43) Date of publication of application: **18 . 08 . 98**

(51) Int. Cl.

**A61K 31/335**  
**A61K 31/335**  
**A61K 31/335**  
**A61K 31/335**  
**A61K 31/335**  
**// C07D313/00**

(21) Application number: **09026636**(22) Date of filing: **10 . 02 . 97**(71) Applicant: **ASAHI CHEM IND CO LTD**

(72) Inventor: **YAGINUMA SATOSHI**  
**UEHARA YUKIMASA**  
**MURAKAMI HIROKO**  
**MIZUNO SATOSHI**

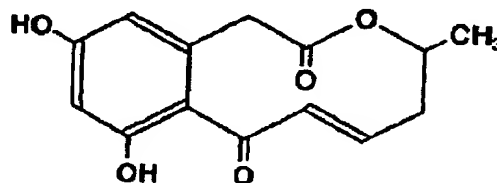
(54) **THERAPEUTIC AGENT FOR PROLIFERATIVE DISEASE**

COPYRIGHT: (C)1998,JPO

(57) Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a preventive and therapeutic agent for proliferative disease having excellent effect of suppressing epidermal growth factor receptor(EGF-R) tyrosine kinase activity by formulating sporostatin.

**SOLUTION:** This medicine contains a compound of the formula or its salt as an active ingredient. The compound of the formula is officially known compound M5032 substance (called sporostatin) and is obtained by culturing the fungus *Sporormiella* sp. M5032 in a medium. The compound formed and accumulated in the cultured product is isolated from the cultured product and purified. This medicine is useful for treatment of malignant proliferative diseases originating from epithelium, e.g. tumors such as mammary carcinoma, esophageal carcinoma, cystocarcinoma, ovarian cancer, vulvar cancer, colon cancer, pulmonary carcinoma, melanoma, mouth cancer and brain tumor, or benign proliferative diseases, e.g. psoriasis, pulmonary fibrosis and polycystic renal disease. It is orally and parenterally administrated at a dose of 0.05-10mg/kg/day/adult.



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-218768

(43) 公開日 平成10年(1998) 8月18日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

A 6 1 K 31/335

識別記号

A D U

A C D

A C V

A D A

A E D

F I

A 6 1 K 31/335

A D U

A C D

A C V

A D A

A E D

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 6 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平9-26636

(22) 出願日

平成9年(1997) 2月10日

(71) 出願人 000000033

旭化成工業株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

(72) 発明者 柳 昭 慧

静岡県田方郡大仁町三福632番地の1 旭  
化成工業株式会社内

(72) 発明者 上原 至雅

東京都町田市金井8-10-36

(72) 発明者 村上 裕子

東京都大田区久が原6-19-6

(72) 発明者 水野 左敏

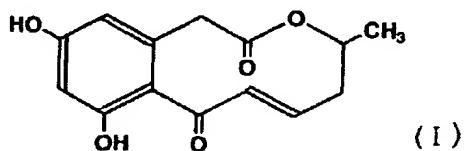
千葉県船橋市夏見台3-10-3-401

(54) 【発明の名称】 増殖性疾患治療剤

(57) 【要約】

【構成】 式 (I)

【化1】



で表される化合物、またはその薬理学上許容される塩を有効成分とする増殖性疾患の予防・治療剤、または上皮増殖因子受容体チロシンキナーゼ活性抑制剤。

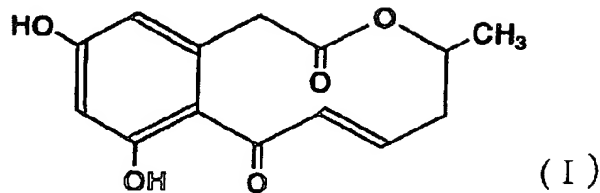
【効果】 EGF-Rチロシンキナーゼ活性を強く抑制し、増殖性疾患、例えば、上皮起源の悪性増殖性疾患である腫瘍（例えば乳癌、食道癌、膀胱癌、卵巣癌、外陰癌、結腸癌、肺癌、黒色腫、口腔癌および脳腫瘍）、あるいは表皮の良性増殖性疾患である乾癬、肺線維症、多嚢胞性腎疾患などの治療に適用できる。

1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 式 (I)

【化 1】



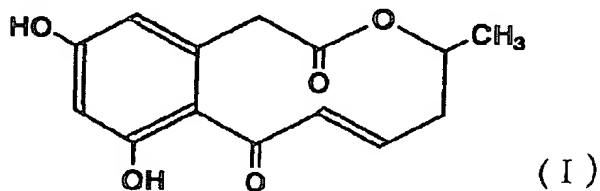
で表される化合物、またはその薬理学上許容される塩を有効成分とする増殖性疾患の予防・治療剤。

【請求項 2】 増殖性疾患が腫瘍、乾癬、肺線維症、多嚢胞性腎疾患のいずれかである請求項 1 に記載の予防・治療剤。

【請求項 3】 腫瘍が上皮起源の腫瘍である請求項 2 に記載の治療剤。

【請求項 4】 式 (I)

【化 2】



で表される化合物、またはその薬理学上許容される塩を有効成分とする上皮増殖因子受容体チロシンキナーゼ活性抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、上皮増殖因子受容体チロシンキナーゼ活性抑制作用を有し、腫瘍、乾癬、肺線維症、多嚢胞性腎疾患などの増殖性疾患の治療に有用な治療剤に関する。

【0002】

【従来の技術】上皮増殖因子受容体 (epidermal growth factor receptor: 以下、EGF-R と表記することがある) は、分子量 170 K D の糖蛋白質で 1 本のポリペプチド鎖からなり、細胞外の EGF (epidermal growth factor) 結合部位、膜貫通部位、そして細胞内のチロシン残基特異的のプロテインキナーゼ部位から構成されており、細胞内ドメインは s r c キナーゼと相同性の高いチロシンキナーゼ活性をもっている [Carpenter, G., et al: J. Biol. Chem., 265, 7709-7712, (1990)]。上皮増殖因子である EGF および EGF と構造的に相同性をもつポリペプチド性増殖因子である TGF- $\alpha$  (transforming growth factor- $\alpha$ ) は、共通の受容体である EGF-R に細胞膜上で結合すると、EGF-R の細胞内ドメインにあるチロシンキナーゼが活性化され、EGF-R 自己リン酸化及び他の蛋白質チロシン残基のリン酸化が誘導される。それと同時に EGF/EGF-R 複合体ある

2

いは、TGF- $\alpha$ /EGF-R 複合体は、受容体媒介エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、リソソームで分解される [Willingham, M. C. et al: J. Cell. Biol., 94, 207-211, (1982)]。それに続いて EGF-R mRNA と EGF-R 合成が促進され [Clark, A. J. L., et al: Proc. Natl. Acad. Sci. US, 82, 8374-8378 (1985)]、最終的には細胞の DNA 合成が誘導されて細胞増殖が観察される [Hollenberg, M. D., et al: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 2964-2969 (1973)]。つまり、EGF-R の過剰発現は腫瘍の細胞増殖に関与しているので治療のターゲットになり得るし、また腫瘍患者の EGF-R チロシンキナーゼ活性の抑制は、腫瘍細胞の増殖を阻害すると考えられる。

【0003】上皮起源の悪性腫瘍、例えば乳癌、膀胱癌、卵巣癌、外陰癌、結腸癌、肺癌、脳腫瘍および食道癌細胞において EGF-R の過剰発現が認められている。腫瘍細胞内での EGF-R の発現は制御不能な増殖を招く自己分泌増殖刺激のある機構を与えることが示唆されている [Schlessinger, J., et al: Crit. Rev. Biochem. 14, 93-111 (1983)]。

【0004】EGF-R は多くの種類の細胞で発現しているが、その発現を癌患者より得られた癌組織や非癌部組織について検討してみると、扁平上皮組織では他の組織に比較して明らかに EGF-R を多く発現しているし、同じ扁平上皮組織でも癌部の方が非癌部よりも高率に過剰発現が認められている [Ozawa, S., et al: Jpn. J. Cancer Res., 79, 1201-1207 (1988)]。

【0005】ヌードマウスに EGF-R 過剰発現扁平上皮癌細胞株を移植し、EGF を持続的に投与すると外因性の EGF に反応してその増殖が促進され、EGF/EGF-R 系が腫瘍細胞の増殖に重要な役割を果たしていることが報告されている [Ozawa, S., et al: Int. J. Cancer 40, 706-710 (1987)]。EGF-R などの増殖因子受容体を過剰発現している乳癌、食道癌症例では、低発現症例に比較して病期、病理、組織型、浸潤度などの背景因子が同じにもかかわらず根治術後の累積生存率が有意に低下していることが明らかにされている [Slamon, D. J., et al: Science 235, 177-181 (1987); Ozawa, S., et al: Cancer 63, 2166-2173 (1989)]。また胃癌や乳癌においても、EGF/EGF-R 系が発現している症例において予後が不良であるという報告もある [Sainsbury, J. R. C., et al: Lancet 8547, 1398-1402 (1987); Sugiyama, K., et al: Cancer 63, 1557-1561 (1989)]。これらのことは、EGF-R を過剰発現している腫瘍細胞は、その生物学的悪性度が高く、しかも患者の予後は極めて不良であり、手術療法のみで完治することが困難であり、集学的治療を必要としていることを示している。また、腫瘍細胞中の EGF-R の存在はヒト乳癌における予後不良の指標となることを示している。

【0006】ホルモン標的組織に発生する乳癌細胞は、

10

20

30

40

50

本来女性ホルモン依存性であるが、実際には原発性乳癌の40%はホルモン非依存性であり、依存性腫瘍においてもその依存性は進行と共に失われていくことが知られている。このホルモン非依存性乳癌においてEGF-Rがエストロゲン受容体と逆相関して特徴的に発達している。これは同時にホルモン療法耐性に直結している〔T oi, M., et al: Cancer65, 1980-1984(1990)〕。

【0007】正常表皮におけるEGF-Rの発現は増殖能のある基底・傍基底層に局限されているが、良性表皮増殖性疾患である乾癬病変部表皮では基底・傍基底層ばかりでなく表皮上層までEGF-Rの発現が認められている。またTGF- $\alpha$ が乾癬病変部角化細胞において過剰発現されていることが知られている〔Amagai, M., et al: Br. J. Dermatol. 119, 661-668(1988); Elder, J. T., et al: Science 243, 811-814(1989)〕。過剰発現されているTGF- $\alpha$ の局在を見てみると、乾癬病変部表皮では正常表皮において認められる基底・傍基底だけでなく、表皮上層においても認められた〔Gottfried, A. B., et al: J. Exp. Med., 167, 670-675(1988)〕。EGF-RとそのリガンドであるTGF- $\alpha$ が乾癬病変部表皮においてともに過剰発現されていることは、乾癬の角化細胞の増殖能亢進に対し、EGF-R/TGF- $\alpha$ の発現が何らかの病因的役割を担っていることが強く示唆されている。

#### 【0008】

【発明が解決しようとする課題】抗腫瘍剤としては、代謝拮抗剤、アルキル化剤、アルカロイド、抗生物質、ホルモンなどが治療剤として用いられている。臨床的にチロシンキナーゼ活性を有するEGF-Rの発現が上皮起源の腫瘍、例えば乳癌、食道癌、膀胱癌、胃癌など種々の癌において予後不良因子となっていることは、EGF-Rチロシンキナーゼ活性の亢進が腫瘍の進行に直接関与していることを示すもので、裏を返せば治療の良い標的ともいえる。EGF-Rチロシンキナーゼ活性が亢進している腫瘍は、細胞増殖が活発で組織学的には未分化な傾向が強く、しばしば既存の治療薬に耐性である。EGF-Rチロシンキナーゼ活性抑制剤は、上皮起源の腫瘍、乾癬、肺線維症、多嚢胞性腎疾患などの増殖性疾患等の予防・治療薬としての発展が期待され、臨床的意義は大きい。

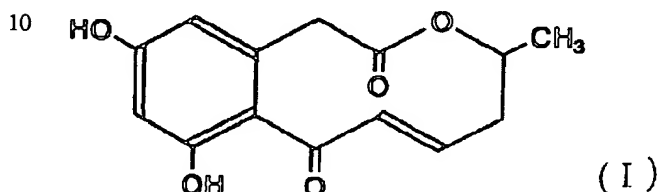
【0009】従来、EGF-Rチロシンキナーゼ活性を抑制する物質としては、アープスタチン〔Umezawa, H., et al: J. Antibiotics 39, 170-173(1986)〕、ゲニステイン〔Ogawara, H., et al: J. Antibiotics 39, 606-608(1986)〕、ラベンダスチンA〔Onoda, T., et al: J. Nat. Prod., 52, 1252-1257(1989)〕等などが報告されている。しかしながら、有効性、持続性、副作用などの点で必ずしも満足されるものではなく、さらに優れたEGF-Rチロシンキナーゼ活性抑制剤又は、増殖性疾患の予防・治療剤の開発が求められている。

#### 【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、上記課題を解決するため鋭意研究した結果、後述の化合物が優れたEGF-Rチロシンキナーゼ活性抑制作用を有し、ひいては腫瘍等の増殖性疾患の治療剤として有用であることを確認し、本発明を完成するに至った。即ち本発明は、式(I)

#### 【0011】

#### 【化3】



【0012】で表される化合物、またはその薬理学的許容される塩を有効成分とする増殖性疾患の予防または治療剤である(以下、予防・治療剤と表記することもある)。また本発明は式(I)で表される化合物、またはその薬理学的許容される塩を有効成分とするEGF-Rチロシンキナーゼ活性抑制剤である。上記式(I)で示された化合物は、特開昭64-83078号公報に開示された公知化合物M5032物質(以下スポロスタチンと称することがある)であり、同公報には、その物性や微生物を用いた製造法等の開示がある。また、スポロスタチンが、環状アデノシン3', 5'-モノリン酸ホスホジエステラーゼ阻害作用を有することの開示はあるが、従来、EGF-Rチロシンキナーゼ活性抑制作用を有することや、抗腫瘍作用を有することについての開示や示唆はない。スポロスタチンは真菌スポロルミエラ・エスピー-M5032(Sporormiella sp. M5032)を培地に培養し、培養物中に生成蓄積させ、該培養物中から精製単離することにより得られる(特開昭64-83078号公報)。スポロスタチンの薬理学的許容される塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩などが例示される。

【0013】スポロルミエラ・エスピー-M5032株の菌学的性状は以下の通りである。

#### 1. 各培地における生育状態

##### 1) ツアベック寒天培地

25℃の場合、生育は非常に悪く、10日間で菌糸が極めて薄く培地上に生育するのみである。菌叢の中心部は灰黄色(greyish yellow; 4C3)で他は無色。菌叢の裏面の中心部は黄褐色(yellowish brown; 5E5)で他は無色。

##### 【0014】2) 麦芽汁寒天寒天培地

25℃の場合、生育は遅く、10日間で菌叢の直径は11-15mm。菌叢は平坦で、菌糸は主として培地中または培地表面に生育し、気中菌糸は少ない。菌叢の表面

はピロード状で、褐橙色 (brownish orange; 6 C 3) であり、周辺部はやや蜘蛛の巣状 (arachnoid)。浸出液は出さない。拡散性色素は褐黄色 (brownish yellow; 5 C 7)。裏面は褐色 (brown; 6 E 5)。

【0015】3) オートミール寒天培地

## 2. 生理学的性状

生育し得る pH 3. 5-10. 5,

生育し得る温度 11-35℃、

## 3. 顕微鏡下における形態的特徴

偽子囊殻は、培地中に半分埋まって生育し、歪球形-洋梨形、暗褐色ないし黒色、直径150-200μm; 頸部は短く乳首状; 殻壁は膜質ないし多少皮質。子囊はほぼ円筒形、8孢子、150-220x20-25μm、頂部は丸く、下部は急に狭まり、短い柄を持つ。偽側糸は糸状、隔壁を有し、幅2. 5-2. 8μm、無色。子囊胞子は褐色で、8孢子、3-4列に配列、円筒形で先端は細まり、大きさは43-50x7-8μm、横断状に隔壁を生じくびれる。先端細胞の大きさは、7-8x5-5. 5μm、中間細胞の大きさは5-5. 5x7-8μm、ゼラチン膜を有し、発芽スリットは対角線に生ずる。分生子世代は観察されない。

【0016】4. 菌の同定と寄託

本菌M5032株は、子囊胞子を形成し増殖することから子囊菌類に属するもので、子囊殻は菌糸塊から発達した偽子囊殻よりなり、子囊が二重壁、子囊胞子が8細胞で発芽スリットを持つ等の特色からスポロルミエラ (Sporormiella) 属に属するものと同定される。スポロルミエラ属は、現在約70種程知られているが、本菌と合致する種は見当たらず、M5032株をスポロルミエラ・エスピーM5032 (Sporormiella sp. M5032) と命名し、昭和62年9月にFERMP-9506として寄託し、さらに再度、平成9年2月5日に工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-16063として寄託した。

【0017】各培地における生育状態の色の表示は、Kornerup A. and Wanscher J.H. 1978" Methuen Handbook of Colour 3rd ed." Eye Methuen, London の表示法に従った。また、菌株の同定については次の文献を参考にした。

1) Ahmed, S. I. and R. F. Cain. Revision of the genera Sporormia and Sporormiella. Can. J. Bot. 50, 419-477 (1972)

2) von Arx, J. A. "The genera of fungi sporulation in pure culture." J. Cramer. 424p.。

【0018】本発明で増殖性疾患とは、EGF-RやTGF-αなどの増殖因子受容体あるいは増殖因子の過剰発現に起因する疾患で、具体的には腫瘍、乾癬、肺線維症、多嚢胞性腎疾患などが挙げられる。腫瘍としては上皮起源の悪性腫瘍が好ましい例として挙げられ、具体的には乳癌、食道癌、膀胱癌、卵巣癌、外陰癌、結腸癌、

\* 25℃の場合、生育は普通で、10日間で菌叢の直径は37-39mm。菌叢は平坦でピロード状、オリーブ灰色 (olive grey; 2 F 2) であり、周辺部は全縁。浸出液および拡散性色素は出さない。裏面はオリーブ褐色 (olive brown 4 F 3)

最適生育 pH 4. 5-8. 0

最適生育温度 28-31℃

肺癌、脳腫瘍、口腔癌、黒色腫などが挙げられる。また上皮起源の良性的増殖性疾患としては乾癬、肺線維症、多嚢胞性腎疾患などが挙げられる。

【0019】スポロスタチン及びその薬理学上許容される塩は、そのままあるいは各種の医薬組成物として経口的または非経口的に投与される。このような医薬組成物の剤形としては、例えば錠剤、丸薬、散剤、顆粒剤、カプセル剤、坐剤、注射剤、点滴剤などが挙げられる。上記剤形の製剤化には、通常知られている方法が適用され、例えば各種の賦形剤、潤滑剤、結合剤、崩壊剤、懸濁剤、等張化剤、乳化剤、吸収促進剤などを含有しても良い。

【0020】医薬組成物に使用される担体としては、例えば水、注射用蒸留水、生理食塩水、各種緩衝液、グルコース、フラクトース、イノシトール、マンニトール、ラクトース、シュクロース、スターチ、セルロース、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、アルギン酸、クエン酸ナトリウム、炭酸カルシウム、リン酸水素カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、尿素、シリコーン樹脂、ソルビタン脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、エチレングリコール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、各種アミノ酸などが挙げられ、これらは製剤の種類に応じて適宜選択される。

【0021】スポロスタチンの投与量は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、患者の年齢、体重などにより決められるが、経口もしくは非経口的投与方法（例えば、注射、点滴、坐剤による直腸投与、皮膚貼付あるいはスプレーによる鼻腔投与など）により、通常成人1日当たり0. 05-10mg/kgである。かくして得られたスポロスタチンまたはその薬理学上許容される塩を有効成分とする医薬組成物は、EGF-Rチロシンキナーゼ活性抑制作用および細胞増殖抑制作用を示し、増殖性疾患の予防または治療剤として有効である。

【0022】次にスポロスタチンのEGF-Rチロシンキナーゼ活性抑制作用および細胞増殖抑制作用について試験例で説明する。チロシンキナーゼの酵素源としては、EGF-Rを過剰発現しているヒト類表皮癌A431細胞 (Japanese Cancer Research Resources Bank; JC RB-9009) の膜画分を用い、基質として angiotensin I I (和光純薬工業社製) を用いた。また細胞増殖抑制試験には、A431細胞、EGF-R高発現株であるヒト

口腔上皮癌HSC-2細胞(JCRB-0622)およびEGF-R高発現株であるヒト乳癌SK-BR-3細胞(American Type Culture Collection; ATCC HTB-30)を用いた。

### 【0023】

#### 【発明の実施の形態】

試験例1 EGF-Rチロシンキナーゼ活性抑制作用  
EGF-R膜画分の調製

A431細胞は、直径10cmのシャーレ10枚を用い、10%牛血清を含むDMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Gibco 社製) を用いコンフルエントに達するまでCO<sub>2</sub>インキュベーター中(37℃、5% CO<sub>2</sub>)で培養した。培養液を除去後、PBS (-) (2.7mM KCl, 1.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.14M NaCl, 8.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>Oを含有する) 溶液5mlで細胞を洗浄した。次いで、1mlのPBS (-) 溶液をくわえ、セルスクラッパーで細胞をかき取り、1,000rpmで5分間遠心し、細胞を集めた。この細胞をPBS (-) 1mlに懸濁させ1,000rpmで1分間遠心することにより細胞画分を洗浄した。この細胞画分をシュウクロース緩衝液[20mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethansulfonic acid; ナカライ・テスク社製)、1mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid; 岩井化学薬品社製)、0.5mM PMSF (phenylmethylsulfonylfluoride; Sigma 社製)、250mM シュウクロース; pH7.4] 2mlに懸濁させ、テフロンホモゲナイザー (Sansyo社製) を用いてホモゲナイズした。3,000rpm、4℃で10分間遠心し、その上清液を得た。この上清液をさらに50,000rpm、4℃で1時間遠心してペレット画分を回収し、20mM HEPES緩衝液(pH7.4) 200μlに懸濁させ、ダウンスホモゲナイザー (Wheaton 社製) を用いてホモゲナイズした。ホモジネートを10,000rpm、4℃で1時間遠心した。その上清液を回収し、蛋白濃度2mg/mlになるように20mM HEPES緩衝液(pH7.4) で調製し、粗EGF-Rチロシンキナーゼ画分として分注し、-80℃で保存し、必要に応じて融解して用いた。

EGF-Rチロシンキナーゼ活性の測定

マイクロチューブに5mM MnCl<sub>2</sub>・4H<sub>2</sub>Oを含む20mM HEPES緩衝液(pH7.4) 4μl、20μg/ml EGF (宝酒造社製) 溶液2μl、10mg/ml Angiotensin II 溶液2μl、0.8% Triton X-100を含む粗EGF-R膜画分5μl、10%DMSOに溶解した各種濃度のスポロスタチン2μlを入れ室温で30分間振盪した。次いで、上記HEPES緩衝液(pH7.4) 2.5μl、[γ-<sup>32</sup>P] ATP [NEN Research Products(Wilmington, DE, USA); 5μCi/μl] 0.5μl、100μM ATP溶液2μlを加え反応を開始した。反応は氷上で15分間行い、氷上で冷20% TCA (trichloroacetic acid; 和

光純薬工業社製) 10μlを加え、15,000rpm、4℃で10分間遠心することにより沈殿物として蛋白を除いた。次いで、遠心上清液40μlをWhatman P81 phosphocellulose (Whatman 社製; 2x2cm) 濾紙上にスポットした。この濾紙を室温で10分間75mMリン酸溶液に浸した。この操作を4回繰り返すことにより濾紙を洗浄した後、更に一度エタノール溶液で洗浄した。濾紙は室温で乾燥し、濾紙上に残存する放射活性量を液体シンチレーションカウンター (Packard 社製) にて測定した。

【0024】結果を表1に示す。

【0025】

【表1】

EGF-Rチロシンキナーゼ活性抑制

濃度 (μg/ml)	EGF-R チロシンキナーゼ活性抑制 (%)
スポロスタチン	
1	100
0.1	56
0.0	0
アープスタチン (対照)	
10	93
1	30
0.0	0

【0026】表1によれば、スポロスタチンはヒト類表皮癌A431細胞のEGF-Rの細胞質部分のチロシンキナーゼ活性を明らかに抑制することが確認された。

試験例2 上皮癌細胞の増殖抑制作用

マイクロプレートにて、10%牛胎仔血清を含むDME M培地で被試験物質スポロスタチンを希釈し、これに前述の各癌細胞5x10<sup>3</sup>/wellをそれぞれ加え、5%CO<sub>2</sub>のインキュベーター中で37℃で4日間培養した後、細胞数をMTT法 [Michael C. Alley et al: Cancer Res., 48:589-601(1988)] でカウントした。なお、被試験物質は水に難溶なので、ジメチルスルホキシドに溶解した後、上記の培地で希釈した。コントロールとして、被試験物質を添加しなかった他は上記の操作を繰り返した。細胞数がコントロールの50%に減少した濃度をIC<sub>50</sub> (μg/ml) として、スポロスタチンのIC<sub>50</sub>を測定した。結果を表2に示す。

【0027】

【表2】

## スボロスタチンの細胞増殖抑制作用

細胞の種類	IC <sub>50</sub> (μg/ml)
A 4 3 1	6. 0
H S C - 2	4. 5
S K - B R - 3	3. 6

【0028】以上のようにスボロスタチンは、上皮癌細胞に対して明らかな増殖抑制効果を示した。またスボロスタチンの急性毒性 (LD<sub>50</sub>) は、マウス腹腔内投与において50mg/kg以上である (特開昭64-83078号公報)。以上の試験結果より、スボロスタチンは優れたEGF-Rチロシンキナーゼ活性抑制作用、ならびに上皮性腫瘍細胞の増殖を抑制し、増殖性疾患の予防・治療剤として有用であることが確認された。

【0029】次に実施例をあげて本発明を説明するが、本発明はこれらのみに限定されるものではない。

【0030】

【実施例】

【0031】

【実施例1】 錠剤

特開昭64-83078号公報の実施例1および実施例2に従って、スボロルミエラ・エスピーM5032 (FERM P-16063; FERM P-9506の再寄託) 株を用いて調製したスボロスタチン50gと、ラクトース20g、コーンスターチ9gおよびカルボキシメチルセルロースカルシウム5gを混合し、10%ヒドロキシプロピルセルロース溶液を加えて常法により練合\*

\*する。この練合液を1.0mmの金属バスケットを取り付けた押し出し造粒機で造粒子し、ステアリン酸マグネシウムを加えて整粒して打錠用顆粒とし、常法により打錠をおこなって1製剤 (170mg) 中スボロスタチン100mgを含む8mm径の錠剤を得た。

【0032】

【実施例2】 カプセル剤

スボロスタチン50g、ラクトース80gおよびポテスターチ38gからなる混合物に、10%ヒドロキシプロピルセルロース溶液を加えて練合し、以下実施例1と同様に造粒し、ステアリン酸マグネシウムを加えてカプセル充填機によりハードカプセルに充填し、常法により1カプセル (170mg) 中スボロスタチンを50mg含むカプセル剤を得た。

【0033】

【実施例3】 ソフトカプセル剤

スボロスタチンの10gをオリーブ油100gに溶かし、得られた溶液を常法によりカプセルに注入することにより、1カプセル当たり10mgのスボロスタチンを含むソフトカプセル剤を得た。

【0034】

【発明の効果】本発明の予防・治療剤は、EGF-Rチロシンキナーゼ活性を強く抑制し、増殖性疾患、例えば、上皮起源の悪性増殖性疾患である腫瘍 (例えば乳癌、食道癌、膀胱癌、卵巣癌、外陰癌、結腸癌、肺癌、黒色腫、口腔癌および脳腫瘍)、あるいは表皮の良性増殖性疾患である乾癬、肺線維症、多嚢胞性腎疾患などの治療に適用できる。

フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>  
// C 0 7 D 313/00

識別記号

F I  
C 0 7 D 313/00